一种用于昆虫性信息素成分单不饱和双键定位的简便方法

孔祥波[1]，赵莉蔺[2]，张 真[1,*]，王鸿斌[1]

（1. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所，国家林业局森林保护重点实验室，北京 100091；
2. 中国科学院动物研究所，北京 100101）

摘要：昆虫利用特定的性信息素成分实现种内信息交流和种间生殖隔离，性信息素成分异构体的细微差异都能导致其生物活性的很大改变。本研究利用二甲基二硫醚(DMDS)甲硫基化反应和气相色谱-电子轰击质谱(GC-EI-MS)的方法对脂肪族单不饱和醇、醛和乙酸酯类昆虫性信息素成分双键在碳链中的位置异构进行系统研究。质谱分析结果表明，含有醇和乙酸酯官能团的单不饱和烯烃甲硫基化衍生物的质谱特征碎片分子离子峰(M^+)及 2 个主要的诊断离子 *m/z* 61 + 14m［H-(CH_2)$_m$-CH = S^+CH_3］和 77 + 14n［CH_3S^+ = CH(CH_2)$_n$OH］（或 119 + 14n，［CH_3S^+ = CH(CH_2)$_n$OOCCH_3］)丰度都很强，可以据此直接推断双键在碳链中的位置。尽管单不饱和醛类化合物 DMDS 衍生物的特征碎片峰也很明显，但是由于羰基的质量数和 2 个亚甲基的质量数相同，不能由低分辨质谱的特征碎片峰直接推断双键在碳链中的位置。DMDS 甲硫基化反应结合 GC-EI-MS 分析方法鉴定昆虫性信息素成分单不饱和双键在碳链中的位置异构，该方法简单快捷，为昆虫性信息素的结构鉴定工作奠定了坚实的基础。

关键词：性信息素；二甲基二硫醚；双键定位；气相色谱-电子轰击质谱；DMDS 衍生物

中图分类号：Q968　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2010)06-0634-06

A simple method to determine the double bond position in monounsaturated insect pheromone compounds

KONG Xiang-Bo[1], ZHAO Li-Lin[2], ZHANG Zhen[1,*], WANG Hong-Bin[1] (1. Key Laboratory of Forest Protection of State Forestry Administration, Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; 2. Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: The unique sex pheromone components were employed by insects in order to achieve their intraspecific communication and interspecific reproductive isolation. However, the trace differences in the isomers of sex pheromone components can affect their biological activity extensively. The monounsaturated pheromone components of major insect pests were methylthiolated with dimethyldisulfide (DMDS) and analyzed by capillary gas chromatography (GC)-electron impact (EI) mass spectrometry (MS) in order to determine the double bond position in the aliphatic monounsaturated chain with alcohol, aldehyde or acetate functional groups. GC-EI-MS analyses of the resulting DMDS adducts of pheromone components with alcohol or acetate functional groups showed simple mass spectra with recognizable molecular ions and two high intensity diagnostic ions at *m/z* 61 + 14m [H-(CH_2)$_m$-CH = S^+CH_3] and 77 + 14n [CH_3S^+ = CH(CH_2)$_n$OH] (or 119 + 14n, [CH_3S^+ = CH(CH_2)$_n$OOCCH_3]) indicating the original double bond position in the aliphatic chain. Although the DMDS adducts of monounsaturated aldehydes also produced the molecular ions of the derivatives and a series of key fragment ions, this can not allow an immediate determination of the position of the double bond in the original unsaturated compounds by low-resolution EI-MS since the nominal mass of a carbonyl group is the same as that of two methylene groups. The location of the double-bond position using the DMDS adducts and GC-EI-MS methods is simple, time efficient, and highly sensitive, and this procedure shows a good prospect in sex pheromone identification.

Key words: Sex pheromone; dimethyl disulfide; double bond position; GC-EI-MS; DMDS adducts

基金项目：国家自然科学基金项目(30300275；30771737)；创新方法工作专项项目(2008IM022000)

作者简介：孔祥波，男，1971 年生，山东人，副研究员，主要从事昆虫化学生态学研究，E-mail：xbkong@sina.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail：zhangzhen@caf.ac.cn

收稿日期 Received：2010-01-22；接受日期 Accepted：2010-04-25

蛾类昆虫利用特定的性信息素成分实现种内信息交流和种间生殖隔离。这些性信息素成分的化学结构特点是具有醇、醛或酯类官能团，在 10 ~ 18 个碳原子的直链碳链上具有不同饱和程度、不同双键位置和不同立体异构的双键（El-Sayed，2009）。利用质谱法研究碳链中的双键位置及立体异构体一直是化学生态学中昆虫信息素分析研究的热点问题（Buser *et al.*，1983；Dunkelblum *et al.*，1985；Takano *et al.*，1989；McElfresh and Millar，1999；孔祥波等，2004；Jham *et al.*，2005）。但是在质谱电子轰击（EI）条件下，由于不饱和脂肪族化合物碳碳双键不容易发生裂解以及在形成分子离子后容易发生氢原子沿碳链重排，所以很难直接根据质谱的特征碎片离子判断双键在碳链中的位置（Carlson *et al.*，1989）。

利用二甲基二硫醚（DMDS）衍生化试剂，Buser 等（1983）对单不饱和酯类化合物和 Vincenti 等（1987）对双不饱和酯类化合物的双键定位问题都进行了深入研究。虽然含有共轭双键的酯类化合物与共轭二烯烃类化合物的甲硫基化反应机理相同，但是质谱裂解方式不同（Takano *et al.*，1989）。然而，利用 4-甲基-1，2，4-三唑啉-3，5-二酮（MTAD）衍生化试剂对昆虫性信息素成分进行共轭双键定位研究，发现 MTAD 衍生化试剂比 DMDS 衍生化试剂具有更多的优点（McElfresh and Millar，1999；孔祥波等，2004）。由于单不饱和酯类和醇类化合物 DMDS 双键定位与醛类化合物的双键定位存在一定的差异（Ho *et al.*，1996），这促使我们选用甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* Hübner、小菜蛾 *Plutella xylostella*（L.）、烟夜蛾 *Helicoverpa assulta* Guenée 和小地老虎 *Agrotis ipsilon* Hufnagel 等害虫的性信息素成分为研究对象，对单不饱和醇、醛和酯类化合物的双键定位问题进行系统研究，探讨各类化合物 DMDS 衍生物的化学反应特性及质谱特征离子的裂解规律，为昆虫性信息素的结构鉴定工作奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试剂

二甲基二硫醚（99%）购自百灵威公司（北京）；顺 9-十四碳烯醇（*Z*9-14:OH，96%）、顺 11-十四碳烯醇（*Z*11-14:OH，95%）、反 11-十四碳烯醇（*E*11-14:OH，98%）、顺 5-十四碳烯乙酸酯（*Z*5-14:OAc，97%）、顺 8-十四碳烯乙酸酯（*Z*8-14:OAc，95%）、顺 9-十四碳烯乙酸酯（*Z*9-14:OAc，95%）、反 9-十四碳烯乙酸酯（*E*9-14:OAc，96%）、顺 11-十四碳烯乙酸酯（*Z*11-14:OAc，98%）、反 11-十四碳烯乙酸酯（*E*11-14:OAc，99%）、顺 7-十四碳烯醛（*Z*7-14:Ald，95%）、顺 9-十四碳烯醛（*Z*9-14:Ald，95%）、顺 11-十四碳烯醛（*Z*11-14:Ald，98%）、顺 11-十六碳烯醛（*Z*11-16:Ald，93%）和反 11-十六碳烯醛（*E*11-16:Ald，97%）购自 Bedoukian Research，Inc.（Danbury，CT，USA）；碘（分析纯）购自北京化工厂；硫代硫酸钠（分析纯）购自北京红星化工厂。

1.2 DMDS 衍生化反应

根据 Buser 等（1983）的方法对单不饱和醇、醛和酯类化合物进行 DMDS 衍生化反应。首先将单不饱和醇（3 个成分）、单不饱和醛（5 个成分）和单不饱和酯（6 个成分）分别用正己烷配成 3 组混标，各组中每个顺式异构体的浓度是 120 ng/μL，反式异构体的浓度是 40 ng/μL。醇、醛和酯类混标各取 10 μL 放到 1 mL 的锥形瓶中，分别加入 50 μL DMDS 试剂和 5 μL 碘溶液（60 mg 碘溶于 1 mL乙醚中），用带特富龙垫的瓶盖拧紧小瓶后放到 40℃的色谱炉箱中反应 19 h。向反应液中加 200 μL正己烷和 100 μL 5% 硫代硫酸钠溶液，然后将有机相分离，少量的无水硫酸钠干燥 2 h，最后用 N_2 浓缩至大约 50 μL，取 2 μL 进质谱分析。

1.3 质谱分析

单不饱和脂肪族醇、醛和酯类化合物及其 DMDS 衍生物在 DB-5MS 毛细管色谱柱上分离（30 m × 0.25 mm i. d. × 0.5 μm film thickness；美国 J&W Scientific 公司产品），在 Finnigan Trace DSQ 质谱仪上分析（EI 源，70 eV，splitless mode）。气相色谱升温程序是 80℃ 保持 1 min，8℃/min 升温到 280℃，保持 15 min。氦气做载气（1.0 mL/min），进样器和传输线温度是 250℃，离子源温度是 220℃。质量扫描范围是 41 ~ 560 amu，每秒扫描 5 次。

2 结果与分析

在碘催化条件下，单不饱和脂肪族醇、醛和酯类化合物很容易发生碳碳双键的甲硫基化反式加成反应，顺式和反式异构体 DMDS 加成后分别形成苏式和赤式加合物。DMDS 衍生物的色谱峰尖锐对

称，不发生明显的异构化反应(图 1：B)，衍生化反应具有立体专一性。*Z*11-16：Ald 和 *E*11-16：Ald 异构体以及 *Z*9-14：OAc 和 *E*9-14：OAc 异构体在 DB-5MS 色谱柱上很难分开，但是相应异构体的 DMDS 衍生物在 DB-5MS 色谱柱上很容易分开(图 1)。单不饱和醇、醛或酯类化合物顺反异构体的 DMDS 衍生物质谱特征离子及丰度基本一致，但是异构体衍生物的色谱保留时间不一致(表 1)。在 DB-5MS 色谱柱上 *E*11-14：OAc 或者醇先于顺式异构体出峰，但是其 DMDS 衍生物的色谱出峰顺序正好相反(表 1)。因此，通过与标准品比较 DMDS 衍生物的色谱保留时间很容易鉴定化合物的立体异构体。

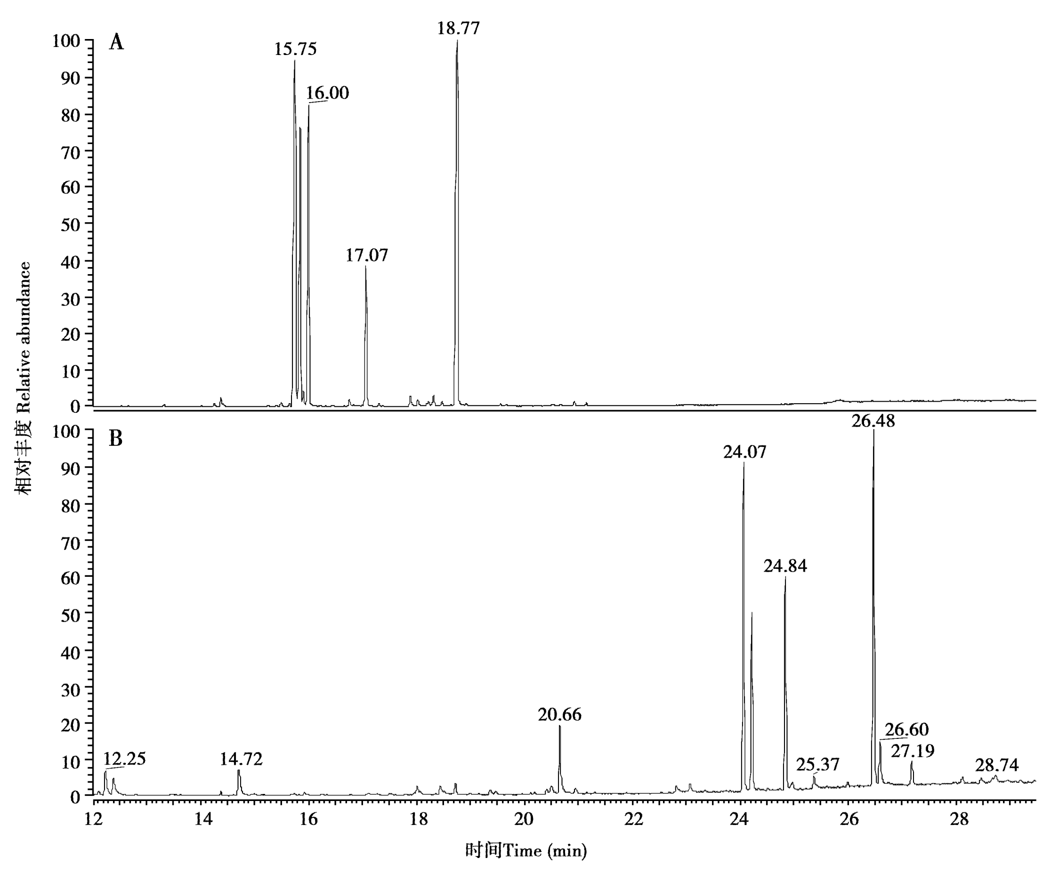


图 1 单不饱和醛类化合物(A)及其 DMDS 衍生物(B)的总离子流色谱图

Fig. 1 Total ion chromatogram of monounsaturated aldehydes and their DMDS adducts

A. *Z*7-14:Ald (15.75 min); *Z*9-14:Ald (15.83 min); *Z*11-14:Ald (16.00 min); *Z*11-, *E*11-16:Ald (18.77 min). B. *Z*7-14:Ald + DMDS (24.07 min); *Z*9-14:Ald + DMDS (24.22 min); *Z*11-14:Ald + DMDS (24.84 min); *Z*11-16:Ald + DMDS (26.48 min); *E*11-16:Ald + DMDS (26.60 min).

醇和酯类化合物在 EI 质谱条件下观察不到分子离子峰。例如，测试的十四碳烯醇和酯类化合物只能在高质量碎片端观察到 *m/z* 194 的碎片峰，对于酯类化合物是分子离子峰减掉醋酸分子产生的碎片，对于醇类化合物是分子离子峰减掉水分子产生的碎片。但是，其 DMDS 衍生物的分子离子峰 *m/z* 348 和 306 非常明显(表 1)，这对于未知物的结构鉴定非常有帮助。

在 GC-EI-MS 分析条件下，单不饱和脂肪族醇、醛和酯类化合物的 DMDS 衍生物均产生很强的分子离子峰(表 1)。裂解位置主要位于甲硫基取代后的 2 个碳原子之间(原双键处)，裂解产生的特征碎片离子丰度很强，很容易推断双键在碳链中的位置。例如，特征碎片离子 *m/z* 117 [A^+：H-$(CH_2)_4$-CH = S^+ CH_3，51.3%] 和 189 [B^+：CH_3S^+ = CH$(CH_2)_8$OH，100%] 能够判断单不饱和十四碳烯醇双键位于碳链的第 9 位。另外，还发现 *Z*9-14：OH DMDS 衍生物很强的分子离子峰 *m/z* 306(M^+，35.1%)及其他次要的特征碎片离子 *m/z* 171 [B^+-H_2O，2.9%] 和 259 [M^+-CH_3S ·，4.7%](图 2：A；表 1)。如果单不饱和十四碳烯醇双键位于碳链的第 4 位，则判断其双键位置的 DMDS 衍生物的特征碎片离子应该是 *m/z* 187 和 119。同理，根据 DMDS 衍生物的特征碎片离子*m/z*

表 1　DMDS 衍生化不饱和醇、醛和酯类化合物的质谱数据

Table 1　Mass spectrometric (EI) of DMDS derivatized unsaturated acetates, alcohols, and aldehydes

DMDS 衍生化的化合物 DMDS derivatized compounds	色谱保留时间 t_R (min)	分子离子(丰度) Molecular ion *m/z* (% Relative abundance)	特征碎片离子(丰度) Diagnostic ion fragments *m/z* (% Relative abundance)		
酯类衍生物 Acetates derivatized		$(M)^+$	$(A)^+$	$(B)^+$	$(B\text{-}60)^+$
*Z*5-14:OAc + DMDS	25.90	348(27.8)	173(100)	175(17.7)	115(29.5)
*Z*8-14:OAc + DMDS	26.03	348(40.5)	131(86.4)	217(100)	157(48.2)
*Z*9-14:OAc + DMDS	26.15	348(30.0)	117(44.1)	231(100)	171(27.4)
*E*9-14:OAc + DMDS	26.26	348(27.3)	117(57.1)	231(100)	171(31.0)
*Z*11-14:OAc + DMDS	26.81	348(21.2)	89(27.6)	259(100)	199(26.9)
*E*11-14:OAc + DMDS	26.94	348(16.4)	89(30.5)	259(100)	199(27.0)
醇类衍生物 Alcohols derivatized		$(M)^+$	$(A)^+$	$(B)^+$	$(B\text{-}18)^+$
*Z*9-14:OH + DMDS	24.94	306(35.1)	117(51.3)	189(100)	171(2.9)
*Z*11-14:OH + DMDS	25.54	306(31.9)	89(34.8)	217(100)	199(6.8)
*E*11-14:OH + DMDS	25.67	306(26.0)	89(33.3)	217(100)	199(6.8)
醛类衍生物 Aldehydes derivatized		$(M)^+$	$(A)^+$	$(B)^+$	$(B\text{-}66)^+$
*Z*7-14:Ald + DMDS	24.07	304(47.0)	145(100)	159(13.7)	93(14.2)
*Z*9-14:Ald + DMDS	24.23	304(39.4)	117(65.7)	187(100)	121(18.0)
*Z*11-14:Ald + DMDS	24.84	304(34.5)	89(43.8)	215(100)	149(16.5)
*Z*11-16:Ald + DMDS	26.48	332(29.9)	117(53.0)	215(100)	149(14.2)
*E*11-16:Ald + DMDS	26.60	332(26.4)	117(68.2)	215(100)	149(15.7)

217(100%)和 89(34.8%)能够判断单不饱和十四碳烯醇的双键位于碳链的 11 位上(图 2：B；表 1)而不是位于碳链的第 2 位上，因为其质谱图没有很强的 *m/z* 215 和 91 特征碎片峰。

*Z*9-14: Ald 能产生很强的特征碎片离子 117 [A^+：H-$(CH2)_4$-CH = S^+CH_3，65.7%] 和 187 [B^+：CH_3S^+ = CH$(CH_2)_7$CHO，100%]（图 2：C；表 1）。但是对于未知的单不饱和脂肪醛类化合物进行 DMDS 双键定位时，并不能直接根据这些特征碎片离子推断双键位于碳链的第 9 位。当单不饱和双键位于碳链的第 4 位时，其也能产生质量数相同的特征碎片离子 187 [H-$(CH2)_9$-CH = S^+CH_3] 和 117 [CH_3S^+ = CH$(CH_2)_2$CHO]，这是由于羰基官能团的质量数相当于 2 个亚甲基的质量数(图 3：A)。如果一个十四碳单不饱和脂肪醛类化合物 DMDS 衍生物的特征碎片离子是 *m/z* 89 [A^+：H-$(CH2)_2$-CH = S^+CH_3，43.8%] 和 215 [B^+：CH_3S^+ = CH$(CH_2)_9$CHO，100%]，就能直接确定双键位于碳链的 11 位(图 2：D；表 1)，因为双键在其他任何位置都不可能产生与其相同质量数的特征碎片离子(图 3：B)。

3　讨论

具有醇、醛或酯官能团的单烯烃与 DMDS 生成衍生物，产物经 GC-EI-MS 分析，产生的特征碎片离子峰明显，能够确定烯烃双键在碳链中的位置甚至其立体异构体，且顺式 DMDS 衍生物先于反式出峰。判断双键位置的特征碎片离子$(A)^+$的产生规律是 *m/z* 61 + 14m(H-$(CH_2)_m$-CH = S^+CH_3)，$(B)^+$的产生规律是 *m/z* 60 + 14n + m_{FG}(CH_3S^+ = CH$(CH_2)_n$FG；FG 表示官能团；m_{FG}表示官能团的质量数)。虽然在 40℃，碘催化，反应 19 h 的条件下，分析的各类化合物容易发生 DMDS 衍生化反应且反应灵敏，但是仍有少量醇、醛或酯类化合物未参加反应。如果用 CS_2 代替正己烷或者提高反应

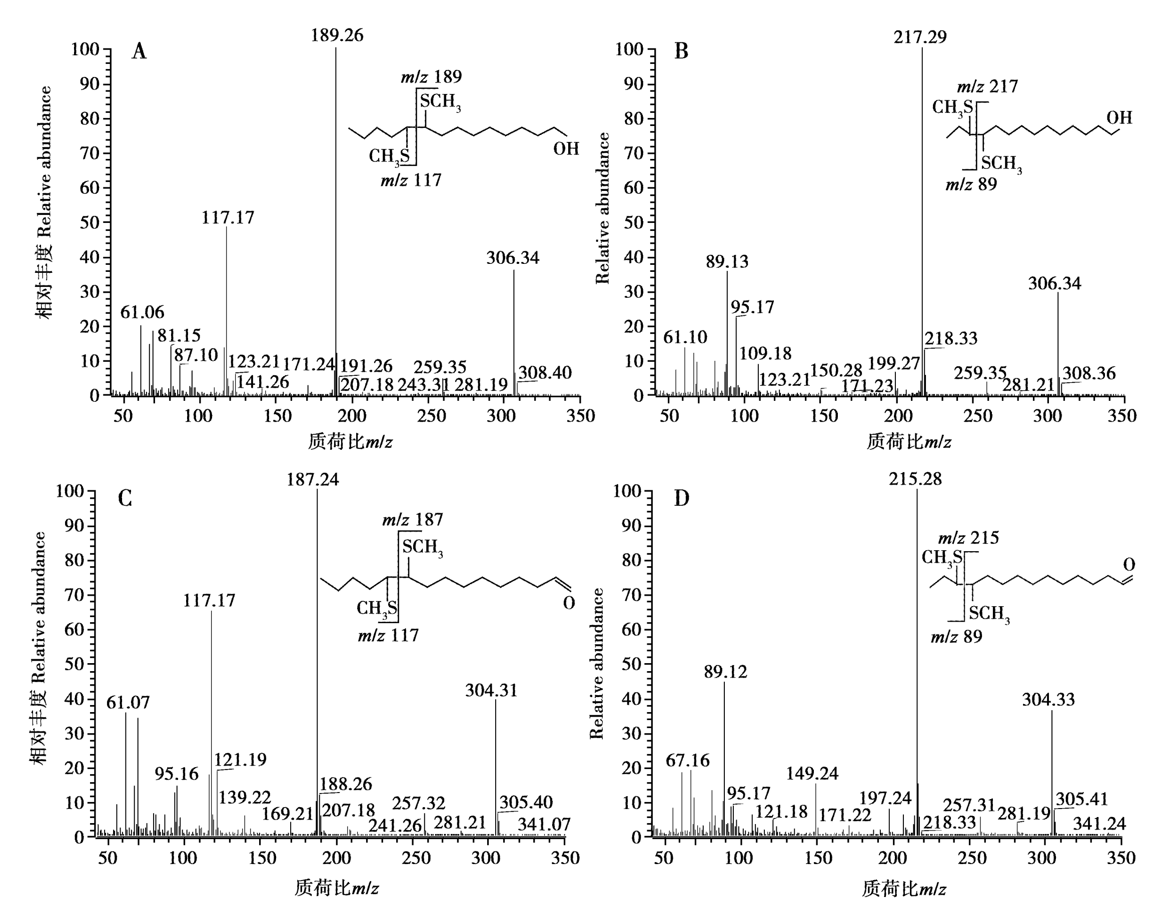


图 2 顺 9-十四碳烯醇(A)，顺 11-十四碳烯醇(B)，顺 9-十四碳烯醛(C)和顺 11-十四碳烯醛(D)DMDS 衍生物的质谱图(70 eV)

Fig. 2 EI mass spectra (70 eV) of DMDS adducts of *Z*9-14:OH (A), *Z*11-14:OH (B), *Z*9-14:Ald (C) and *Z*11-14:Ald (D)

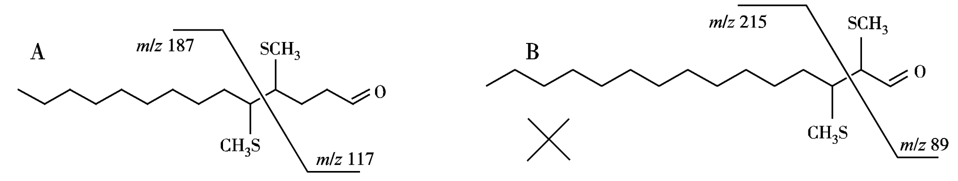


图 3 推断的单不饱和醛类化合物 DMDS 衍生物的质谱碎片模式图

Fig. 3 Fragmentation patterns expected from DMDS adducts of candidate aldehydes

A：4-十四碳烯醛 DMDS 衍生物 *Z*- or *E*-4-tetradecenal DMDS adducts；B：2-十四碳烯醛 DMDS 衍生物 *Z*- or *E*-2-tetradecenal DMDS adducts.

温度(80℃)，衍生化反应速度会加快，但是提高反应温度会产生一些副产物干扰分析结果(Attygalle, 1998)。

脂肪族单不饱和醇、醛和酯类化合物的 DMDS 衍生物质谱图均有 *m/z* 61 的碎片峰，其来源于特征碎片离子 $CH_3S^+ = CH_2$。但对于酯类 DMDS 衍生物，其丰度也有一部分来源于 $CH_3COOH_2^+$ 特征碎片离子(Buser *et al.*, 1983)。未 DMDS 衍生化的酯类化合物也产生 *m/z* 61 的碎片峰，但是其丰度一般低于 10%，与 DMDS 衍生物的 *m/z* 61 碎片峰丰度 20% ~ 50% 相差很多(Leonhardt and Devilbiss, 1985)。可以通过单离子监测特征碎片离子 *m/z* 61，检测到低于纳克数量级的信息素成分。*Z*11-14:Ald的 DMDS 衍生物具有 *m/z* 215 和 89 特征碎片峰，理论上如果双键位于碳链的第 2 位，也能产生质量数相同的特征碎片。但是由于位于第 2 位的碳碳双键与羰基官能团共轭，其并不能与 DMDS 发生衍生化反应(Leonhardt and Devilbiss, 1985; Attygalle, 1998)，所以能根据 *m/z* 215 和 89 的特征碎片峰直接推断不饱和双键位于碳链的 11 位。

对于其他类型脂肪族单不饱和醛类化合物进行双键定位时，由于羰基的质量数和 2 个亚甲基的质量数相同，低分辨质谱并不能判断哪个质量碎片含有醛官能团，所以根据质谱图的特征碎片离子进行双键定位时可能出现 2 种判断结果。如果有标准品的情况下，可以通过比较色谱保留时间或者通过高分辨质谱判断单不饱和醛类化合物的双键位置。在没有高分辨质谱的情况下，可以先由 $LiAlH_4$ 将羰基官能团还原成醇，再进行 DMDS 衍生化反应，这样可以间接准确推断单不饱和醛类化合物的双键位置（Ho *et al.*, 1996）。

致谢　本文承蒙山西农业大学张金桐教授审阅，并提出许多宝贵的修改意见，我们表示衷心的感谢。

参 考 文 献（References）

Attygalle AB, 1998. Microchemical techniques. In: Millar JG, Haynes KF eds. Methods in Chemical Ecology – Chemical Methods. 207 – 294.

Buser HR, Arn H, Guerin P, Rauscher S, 1983. Determination of double bond position in mono-unsaturated acetates by mass spectrometry of dimethyl disulfide adducts. *Anal. Chem.*, 55(6): 818 – 822.

Carlson DA, Roan CS, Yost RA, Hector J, 1989. Dimethyl disulfide derivatives of long chain alkenes, alkadienes, and alkatrienes for gas chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 61: 1564 – 1571.

Dunkelblum E, Tan SH, Silk PJ, 1985. Double-bond location in monounsaturated fatty acids by diemthyl disulfide derivatization and mass spectrometry: Application to analysis of fatty acid in pheromone glands of four Lepidoptera. *J. Chem. Ecol.*, 11(3): 265 – 277.

El-Sayed AM, 2009. The Pherobase: Database of Insect Pheromones and Semiochemicals. <http://www.pherobase.net>.

Ho HY, Tao YT, Tsai RS, Wu YL, Tseng HK, Chow YS, 1996. Isolation, identification, and synthesis of sex pheromone components of female tea cluster caterpillar, *Andraca bipunctata* Walker (Lepidoptera: Bombycidae) in Taiwan. *J. Chem. Ecol.*, 22(2): 271 – 285.

Jham GN, Attygalle AB, Meinwald J, 2005. Location of double bonds in diene and triene acetates by partial reduction followed by methylthiolation. *J. Chromatogr.*, 1077: 57 – 67.

Kong XB, Zhao CH, Zhang Z, Wang HB, 2004. Determination of double bond position in conjugated dienes in sex pheromones of *Dendrolimus* spp. *Chin. J. Chromatogr.*, 22(2): 97 – 100.［孔祥波，赵成华，张真，王鸿斌，2004. 松毛虫性信息素共轭双键定位方法的研究. 色谱，22(2): 97 – 100］

Leonhardt BA, Devilbiss ED, 1985. Separation and double-bond determination on nanogram quantities of aliphatic monounsaturated alcohols, aldehydes and carboxylic acid methyl esters. *J. Chromatogr.*, 322: 484 – 490.

McElfresh JS, Millar JG, 1999. Sex pheromone of the common sheep moth, *Hemileuca eglanterina*, from the San Gabriel Mountains of California. *J. Chem. Ecol.*, 25(4): 687 – 709.

Takano I, Kuwahara Y, Howard RW, Suzuki T, 1989. Location of double bond positions in conjugated alkadienes by electron impact mass spectrometry of 3,4-dimethylthio-substituted thiolane derivatives. *Agric. Biol. Chem.*, 53(5): 1413 – 1415.

Vincenti M, Guglielmetti G, Cassani G, Tonini C, 1987. Determination of double bond position in diunsaturated compounds by mass spectrometry of dimethyl disulfide derivatives. *Anal. Chem.*, 59: 694 – 699.

（责任编辑：赵利辉）